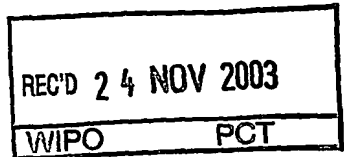


10 / 5301 16

PCT/EP 03 / 1 08 83

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

01 APR 2005

**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

102 46 262.3

**Anmeldetag:**

02. Oktober 2002

**Anmelder/Inhaber:**Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissen-  
schaften eV, München/DE**Bezeichnung:**Vorrichtung und Verfahren zur Entnahme von flüssi-  
gen Proben**IPC:**

C 12 M 1/26

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**München, den 8. Oktober 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag**BEST AVAILABLE COPY**

**CHRISTIAN HANNKE**  
**PATENTANWALT**  
St.-Kassians-Platz 6  
93047 Regensburg

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung  
der Wissenschaften e.V.  
Hofgartenstraße 8  
80539 München

02. Oktober 2002  
GAI-012-DE  
HA/bj

Bundesrepublik Deutschland

---

Vorrichtung und Verfahren zur Entnahme von flüssigen Proben

---

**Beschreibung**

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Entnahme von flüssigen Proben aus mit einem Medium gefüllten Behältern und/oder Rohren, insbesondere aus Fermentern, über eine Filtermembran mittels Unterdruck gemäß den Oberbegriffen der Patentansprüche 1 und 15.

5 Eine Vorrichtung zur Entnahme von flüssigen Proben aus einem Fermenter ist aus der DE 32 49 399 T1 bekannt. Für die Entnahme der Probe weist die Vorrichtung einen Probenehmer in Form eines normal geschlossenen Ventils auf, an dessen Gehäuse auf der Seite eines Kontaktes mit einem Probeaufnehmer ein ringförmiger Vorsprung ausgebildet ist, der zur Aufnahme einer Ringnut eines Gehäuses eines normal geschlossenen Ventils des Probeaufnehmers vorgesehen ist. Zwischen dem normal geschlossenen Ventil des Probeaufnehmers und einem Halt des Probeaufnehmers ist ein bakteriendichter Filter angeordnet, der zu dem normal geschlossenen Ventil des Probenehmers beabstandet ist. Diese Beabstandung hat zur Folge, dass bei der Entnahme einer Probe ein dadurch entstandener Zwischenraum innerhalb der Vorrichtung ebenso mit der Probeflüssigkeit gefüllt werden muß, jedoch nicht als zu überprüfende Probeflüssigkeit in den Probeaufnehmer mit aufgenommen wird. Ein dadurch entstandenes Totvolumen der entnommenen Probe bewirkt, dass zum einen die Probenahme nicht sparsam in Bezug auf das benötigte Probenvolumen pro Probeentnahme durchgeführt werden kann, und zum anderen ein Restvolumen aus der vorangegangenen Probeentnahme innerhalb der Vorrichtung zurückgeblieben ist, das aufgrund seiner nicht-sterilen Eigenschaften zu einer

10

15

20

Verfälschung der Prüfergebnisse der nachfolgend durchgeführten Probeentnahme mit gewünschter Sterilität führen kann.

Bekannt sind auch kommerziell erhältliche Probenahmeverrichtungen zur Entnahme von Proben einer in einem Bioreaktor mit einem beispielsweise 5-Liter-Volumen durchgeführten Fermentation, die stabförmig ausgebildet sind und an deren Ausgang sich ein Drei-Wege-Ventil befindet, wie es beispielsweise in der US 5,948,998 gezeigt wird. Das Drei-Wege-Ventil dient zur Umschaltung des Strömungsverlaufs während der Probenahme von dem Weg zwischen der Probenahmesonde und dem Ausgang auf einen Weg zwischen einem Überströmablauf und dem Ausgang. Eine derartige Umschaltung der Strömungswege findet statt, nachdem eine Probe mit wunschgemäßem Volumen in ein der Probenahmesonde nachfolgendes Leitungssystem gefördert wurde.

Aufgrund dieses Umschaltvorganges reißt der innerhalb der Vorrichtung bestehende Flüssigkeitsstrom ab, wodurch eine verstärkte Durchmischung der Probeströmung erhalten wird. In diesem Fall führt die höhere Durchmischung zur Vergrößerung des benötigten Probevolumens oder der Anzahl der zu entnehmenden Proben bis zur Einstellung einer konstanten Konzentration der Substanzen innerhalb der Probe, da eine Rückvermischung einzelner Substanzen aufgrund einer nicht idealen Verdrängung der Probenflüssigkeit aus der Vorrichtung aus der vormals durchgeführten Probenahme stattfindet. Da derartige Probenahmeverrichtungen ein Totvolumen aufweisen, ist die restliche Probeflüssigkeit der vorangegangenen Probenahme nicht vollständig aus der Vorrichtung verdrängbar, wodurch aufgrund der fluiddynamischen Eigenschaften der Probeflüssigkeit eine Rückvermischung stattfindet.

Zudem findet eine Rückvermischung auch aufgrund unterschiedlicher Diffusionskoeffizienten der in der Probe enthaltenen Substanzen statt.

DE 195 30 886 C1 betrifft eine Probenahmeverrichtung, die fluidische Dioden zur tropfenweisen Dosierung der zu entnehmenden Probe und einer Kalibrierlösung ermöglicht. Die fluidischen Dioden sind zwischen der zu dem Medium hingeorordneten Filtermembran und einem Sensor zur Detektion bestimmter Prüfdaten angeordnet. Da die fluidischen Dioden selbst kleine Abmessungen aufweisen, ist ein Totraum zwischen der Filtermembran und dem Sensor minimiert.

Derartige Probenahmeverrichtungen weisen ebenso ein Totvolumen innerhalb des Totraums bei der Probenahme auf, das zum einen eine Probenahme mit höherem Volumen erfordert, und zum anderen die Gefahr einer Vermischung der in dem Totvolumen angeordneten Restprobe aus der vorangegangenen Probenahme mit den Probesubstanzen der neuen Probenahme aufwirft.

Die vorgenannten Vorrichtungen lassen eine Überprüfung der Unversehrtheit der zu dem Medium hin angeordneten Filtermembran nur bedingt oder mit großem Aufwand zu, wie beispielsweise den Ausbau der Filtermembran. Eine Undichtigkeit der Filtermembran hat zur Folge, dass die Sterilgrenze des Behälters oder der Rohrleitung durchbrochen und das Medium unsteril wird.

Desweiteren ist eine Überprüfung der Dichtigkeit der Filtermembran lediglich vor dem Einbau und nach dem Ausbau einer Probeentnahmeverrichtung möglich, so dass immer erst das Ende des gesamten Prozesses oder Messzyklus abzuwarten ist, bevor ein derartiger Integritätstest durchgeführt werden kann.

Demzufolge liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Entnahme von flüssigen Proben aus mit einem Medium gefüllten Behältern und/oder Rohren über eine Filtermembran zur Verfügung zu stellen, bei der/dem eine Entnahme der Probe ohne Totvolumen unter zuverlässig sterilen Bedingungen, die mittels eines Integritätstests jederzeit überprüft werden können, möglich ist.

Diese Aufgabe wird vorrichtungsseitig durch die Merkmale des Patentanspruches 1 und verfahrensseitig durch die Merkmale des Patentanspruches 15 gelöst.

Kerngedanke der Erfindung ist es, bei einer Vorrichtung zur Entnahme von flüssigen Proben aus mit einem Medium gefüllten Behältern und/oder Rohren, insbesondere aus Fermentern, über eine Filtermembran mittels Unterdruck, der z. B. durch eine Pumpe erzeugt werden kann, die innerhalb einer Probensonde angeordnete Filtermembran aus einem als Sterilgrenze wirkenden Material anzufertigen, wobei auf der sterilen Grenzseite der Filtermembran eine gasführbare Zuführleitung und eine probeführbare Abführleitung angeordnet sind. Die probeführbare Abführleitung ist mit der Pumpe zur Bildung eines Unterdrucks, aufgrund dessen die Probe durch die Filtermembran hindurch aus dem Medium angesaugt wird, verbunden.

Nach erreichter Entnahme einer Probe mit einem vorbestimmten Probenvolumen, welches z. B. mittels der Pumpe reguliert wird, wird die Probe mit zusätzlichem geringem Gasüberdruck, das einer zur Vorrichtung hingewandten Rückseite der Filtermembran mittels der Zufuhrleitung zugeführt wird, über die Abführleitung aus dem Leitungssystem der Probenahmeverrichtung abgeführt. Gleichzeitig wird das Leitungssystem zuverlässig mittels des zugeführten Gases entleert. Auf diese Weise ist kein Totraum innerhalb der Probenahmeverrichtung für die Bildung eines Totvolumens vorhanden. Somit ist eine Entnahme der Probe mit dem gewünschten zu überprüfenden Probenvolumen selbst bei kleinen Volumenmengen möglich, ohne dass zusätzliches Probenvolumen für das Zur-

5

10

Verfügung-Stellen eines Totvolumens notwendig ist.

Da die Filtermembran mit dem als Sterilgrenze wirkenden Material ausgestattet ist, wird die Entnahme einer sterilen Probe, unter der Voraussetzung, dass das Leitungssystem und die restlichen Einrichtungen der Probenahmeverrichtung in sich steril sind, sichergestellt.

15

Selbst wenn die Membran eine Undichtigkeit aufweist, ist eine sterile Funktion der Probenahmeverrichtung sichergestellt, vorausgesetzt, dass der aufgrund der Undichtigkeit entstehende Druckabfall im Leitungssystem während des Probenahmeproganges fortlaufend durch das zuzuführende Gas ausgeglichen wird. Es kann zwar aufgrund der defekten Filtermembran etwas Spülflüssigkeit zum wahlweisen Ausspülen des Leitungssystems in das Medium gelangen, jedoch beeinflusst die Verdünnung des Mediums durch die Spülflüssigkeit, die beispielsweise destilliertes Wasser sein kann, die Konzentration der in dem Medium enthaltenen Substanzen nicht nachweisbar..

20

25

Das zur Entleerung des Leitungssystems verwendete Gas ist beispielsweise Druckluft, die wie ein hydrophobes Medium wirkt. Demgegenüber ist die Filtermembran aus einem hydrophilen Material zusammengesetzt, das nur bei hohem Überdruck von dem Gas durchdrungen werden kann. Eine durch diese Eigenschaften des Gases und des Filtermembranmaterials hervorgerufene zuverlässige Entleerung des Leitungssystems ohne Durchdringung der Filtermembran in Richtung des Mediums hat eine vollständige Befreiung nicht nur des Leitungssystems, sondern auch der restlichen Vorrichtungseinrichtungen von der Probenflüssigkeit der vorangegangenen Probenahme zur Folge. Somit wird auf einfache Weise eine vollständige Entleerung des Vorrichtungsinnenraumes von Probenflüssigkeit und einer dadurch bedingten totvolumenfreie Probenahme erreicht.

30

35

Vorteilhaft kann auch aus nicht-sterilen Medien eine sterilgefilterte Probe entnommen werden, da die Filtermembran als Sterilgrenze dient. Derartigen sterilgefilterten Proben ist eine erhöhte Lagerfähigkeitsdauer zu eigen.

5

Da eine automatische Entleerung auf einfache und wirkungsvolle Art im Anschluß an die Probenahme stattfindet, ist die erfindungsgemäße Probenahmeverrichtung als Probenahmemodul automatisiert einsetzbar und ermöglicht den Anschluß von Detektionssystemen, die für eine prozessnahe Kontrolle und Regelung/Steuerung der entnommenen Probe und der erfindungsgemäßen Vorrichtung dienen.

10

Zudem kann der Zeitraum für einen Probenahmevergang durch geeignete Kombination von dem zu entnehmenden Probenvolumen, der durch die Pumpe bedingten Fördergeschwindigkeit und der benötigten Zeitspanne für die Entleerung des Leitungssystems ausreichend kurz für Online-Messungen gehalten werden.

15

Ein Integritätstest zur Überprüfung der Dichtigkeit der Filtermembran ist zu einem beliebigen Zeitpunkt möglich. Ein derartiger Test kann vor und nach einem Probenahmevergang durchgeführt werden und ermöglicht demzufolge eine Erhöhung der Betriebssicherheit des Behälters, der einen Bioreaktor darstellen kann, in Verbindung mit der daran befestigten Probenahmeverrichtung und eine Verbesserung der Handhabung der Probenahmeverrichtung.

20

Für einen Integritätstest, der die Funktion der Probenahmeverrichtung in situ überprüft, ist die gasführbare Zuführleitung mit einer ersten gasführenden Anschlussleitung zum verbinden der Zuführleitung mit einem Gasversorgungsanschluß gekoppelt. Eine derartige Koppelung ist ebenso für die Zuführung des Gases zur Entleerung des Leitungssystems erforderlich.

25

Ein erstes und zweites Ventil sind im Bereich eines ersten und zweiten Endes der ersten gasführenden Anschlußleitung gemäß einer bevorzugten Ausführungsform angeordnet, so dass die Anschlussleitung beiderseitig mittels des Ventils gesperrt werden kann. Zusätzlich sind ein Drucksensor in der gasführenden Anschlussleitung sowie ein erster Sterilfilter im Bereich des Gasversorgungsanschlusses innerhalb der gasführenden Anschlussleitung angeordnet, so dass der sterile Betrieb des Leitungssystems und

30

35

insbesondere der gasführenden Anschlussleitung sichergestellt ist und eine Überprüfung des üblicherweise leichten Überdrucks innerhalb der Gasleitung möglich ist.

5 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sind die Zu- und Abführleitungen derart ausgebildet, dass sie zum Zu- und Abführen von Spülflüssigkeit zu und von der Filtermembran geeignet sind. Die Spülflüssigkeiten wird mittels einer zweiten spülflüssigkeitführenden Anschlussleitung in die gasführbare Zuführleitung eingespeist und dient zum Spülen des gesamten Leitungssystems und der Filtermembran, um das Verkleben und Verstopfen, insbesondere der Abführleitung, durch Inhaltsstoffe der Substanzen der 10 Probe zu vermeiden. Die Spülflüssigkeit ist eine sterile Flüssigkeit. Nach dem Spülvorgang wird das Leitungssystem wiederum mit Gas aus der ersten Anschlußleitung mit geringem Überdruck entleert. Ein derartiger Spülvorgang kann optional zwischen zwei Probenahmevorgängen durchgeführt werden.

15 Vorteilhaft weist ein Verfahren zur Entnahme von flüssigen Proben aus mit dem Medium gefüllten Behältern und/oder Rohren mittels der Filtermembran folgende Schritte auf:

- Zuführen des Gases zu der in der Probesonde angeordneten Filtermembran aus dem als Sterilgrenze wirkenden Material auf der sterilen Grenzseite der Filtermembran mittels der mit mindestens einem Ventil gegenüber anderen Leitungen sperrbaren Zuführleitung;
- 20 - Abführen des Gases von der Filtermembran mittels der Abführleitung und ventilwirkender Vorrichtung, wie eine Pumpe, solange, bis die Zu- und Abführleitungen probenfrei sind;
- Schließen mindestens eines Ventils zum Abkoppeln der Zuführleitung von dem Gasversorgungsanschluß;
- Entnahme der Probe mit gewünschtem Volumen aus dem Medium mittels der 25 Abführleitung und einem Unterdruck, der ebenso mittels der Pumpe erzeugt werden kann; und
- Beförderung der Probe aus der Abführleitung mittels des mit Überdruck erneut zugeführten Gases.

30 Zusätzlich kann zur Vermeidung von Verstopfungen und Verklebungen der Abführleitung das Verfahren den Schritt der Zuführung von Spülflüssigkeit und für die Durchführung des Integritätstests die Zuführung von Gas unter Abschluß des Vorrichtunginnenraums mittels Ventilen gegenüber den umliegenden Systemen beinhalten.

35 Weitere vorteilhafte Ausführungsformen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Vorteile und Zweckmäßigkeiten sind der nachfolgenden Beschreibung in Verbindung mit der Zeichnung zu entnehmen. Hierbei zeigen:

5 Fig. 1 eine schematische Darstellung einer Vorrichtung zur Entnahme von Proben gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung,

Fig.2 eine schematische Darstellung eines Ausschnitts der Vorrichtung zur Entnahme von Proben gemäß einer zweiten Ausführungsform der Erfindung;

10 Fig. 3 ein Diagramm gemessener Glukosekonzentrationen über einen bestimmten Zeitraum hinweg bei Probenahmevergängen mit einer vergleichenden Darstellung von Probenahmen mittels einer erfindungsgemäßen Vorrichtung und mittels einer herkömmlichen, kommerziell erhältlichen Vorrichtung, und

15 Fig. 4 ein Diagramm gemessener Lactatkonzentrationen über einen bestimmten Zeitraum hinweg bei Probenahmevergängen mit einer vergleichenden Darstellung von Probenahmen mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung und mittels der herkömmlichen, kommerziell erhältlichen Vorrichtung.

20 Figur 1 zeigt in einer schematischen Darstellung eine Vorrichtung zur Entnahme von Proben aus einem mit einem Medium gefüllten Behälter gemäß einer Ausführungsform der Erfindung. In das in dem Behälter 1 enthaltene Medium 2 ist eine Probenahmesonde 3 und ein Rührer 4 zum Umrühren des Mediums 2 geführt. Innerhalb der Probenahmesonde 3 ist eine Filtermembran aus einem als Sterilgrenze wirkenden Material angeordnet. Die Filtermembran 5 weist eine sterile Rückgrenzseite 5a und eine zu dem Medium hingewandte Vordergrenzseite 5b auf, wobei das Medium steril oder nicht-steril ausgebildet sein kann.

25  
30 An der Rückgrenzseite 5a der Filtermembran 5 – also auf der sterilen Grenzseite der Filtermembran – ist eine gasführbare Zuführleitung 6 und eine probeführbare Abführleitung 7 angeordnet. Über die Abführleitung 7 kann eine Probe, die durch einen Unterdruck einer Pumpe 8 durch die Filtermembran 5 hindurch aus dem Medium angesaugt wird, in eine hier nicht gezeigte Detektoreinrichtung oder einen hier nicht gezeigten Vorratsbehälter abgeführt werden, wie es durch den Pfeil 9 angedeutet wird.



Die Zuführleitung 6 ist mittels eines T-Stückes 10 mit einer ersten gasführenden Anschlussleitung verbunden, die wiederum mit einem Gasversorgungsanschluß 15 in Verbindung steht. Über den Gasversorgungsanschluß 15 wird Druckluft der Zuführleitung 6 zugeführt, sofern sperrbare Ventile 11 und 14 in ihrer Öffnungsstellung angeordnet sind.

5

Um eine Zuführung von steriler Druckluft sicherzustellen, ist ein Sterilfilter 12 angeordnet. Zusätzlich wird die unter leichtem Überdruck zugeführte Druckluft mittels eines Manometers 13 druckgeprüft.

10

An dem weiteren Ende des T-Stücks 10 ist eine zweite spülflüssigkeitsführende Anschlußleitung 17 angeschlossen, die mit einem Behälter 18 in Verbindung steht, in dem Spülflüssigkeit 19, wie beispielsweise destilliertes Wasser, in ausreichendem Maße vorhanden ist. Eine Gas- und Spülflüssigkeitsanschlussleitung 20 verbindet den Behälter 18 über einen darin angeordneten zweiten Sterilfilter 26 mit einem weiteren

15

Gasversorgungsanschluß 23, um einen Druckausgleich für den Behälter 18 zu schaffen. Dieser Gasversorgungsanschluß 23 ist wahlweise zuschaltbar.

20

Sofern ein Spülvorgang durchgeführt werden soll, wird ein Ventil 16 zur Zuführleitung 6 hin geöffnet, während die Ventile 11 und 14 der ersten gasführenden Anschlußleitung geschlossen werden. Nachdem die Spülflüssigkeit die Zu- und Abführleitungen 6, 7 über die Pumpe 8 verlassen hat, und eine Spülung der Leitungen 6, 7 und der Rückgrenzseite 5a der Filtermembran durchgeführt worden ist, wird das Ventil 16 geschlossen und die ersten und zweiten Ventile 11, 14 werden geöffnet, um einen Entleerungsvorgang des Leitungssystems mit den Zu- und Abführleitungen 6, 7 mittels der zugeführten sterilen Druckluft zu bewirken.

25

Bei einem Probenahmevergange findet folgender Ablauf statt:

30

Die Pumpe 8 erzeugt, während das erste und zweite Ventil 11, 14 geschlossen sind, einen Unterdruck innerhalb des Leitungssystems, der eine Probe aus dem zu untersuchenden Medium 2 durch die Sterilgrenze hindurch aus der Probenahmesonde fördert. Das gewünschte Probevolumen wird mittels der Pumpstärke der Pumpe 8 reguliert. Nach Erreichen eines vorbestimmten Probevolumens mit einer vorbestimmten Förderzeit wird die Probe mit zusätzlichem geringen Druckluftüberdruck bei geschlossenem Ventil 16 und offenen Ventilen 11 und 14 aus dem Leitungssystem mit den Leitungen 6, 7 gefördert und in einen hier nicht gezeigten Vorratsbehälter eingespeist. Gleichzeitig bewirkt die zugeführte Druckluft zuverlässig eine Entleerung des Leitungssystems, so dass dieses probefrei ist.

35

Für einen durchführbaren Integritätstest zur Überprüfung der Funktion der Probenahmeverrichtung wird über den Gasversorgungsanschluß 15 bei geschlossenem Ventil 16 und nicht betriebener Pumpe 8 Druckluft zur Erzeugung eines Überdrucks im Leitungssystem zugeführt. Der Überdruck bleibt nach Schließen des Ventils 14 weiterhin erhalten, sofern die Filtermembran 5, welche die Sterilgrenze bildet, dicht ist. Wenn der Druck hingegen abfällt, deutet dies auf eine undichte Filtermembran 5 hin. Die Vorrichtung ist somit bei Anschluß eines Integritätsmessgerätes validierbar.

Figur 2 zeigt in einer schematischen Darstellung einen Ausschnitt der Vorrichtung zur Entnahme von Proben gemäß einer zweiten Ausführungsform der Erfindung. In dieser Ausführungsform ist zusätzlich ein Spülflüssigkeitsversorgungsanschluß 22 mit dem Behälter 18 über einen spülflüssigkeitsführenden Teil der Leitung 20 und einem jeweils dazwischen angeordneten weiteren Sterilfilter 21 und weiteren Ventil 24 verbunden. Der Spülflüssigkeitsversorgungsanschluß 22 dient zum Wiederauffüllen des Behälters 18 mit Spülflüssigkeit.

Der gasführende Teil der Leitung 20 weist zusätzlich ein weiteres Ventil 25 zwischen dem Filter 26 und dem Gasversorgungsanschluß 23 zum Zuführen, Abführen oder Dosieren von Gas auf.

Figur 3 zeigt in einem Diagramm in einer vergleichenden Darstellung eine Glukosekonzentration über einen bestimmten Zeitraum hinweg eine Probeentnahme für einen Probenahmevergung mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung und mittels einer kommerziell erhältlichen herkömmlichen Vorrichtung.

Es wurden beide Probenahmeverrichtungen in einen Bioreaktor eingebaut. Der Bioreaktor wurde sterilisiert und mit sterilem Medium, Carriern und Zellen befüllt. Die Zellen sollten durch ihr Wachstum die Glukose- und Lactatkonzentration im Medium ändern.

Nach Abschluß aller Vorbereitungen und der Sterilisation wurde bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung ein Membrantest durchgeführt. Dann wurde mit beiden Vorrichtungen jeweils eine Probe entnommen und die Glukose- und Lactatkonzentration bestimmt. Bei der herkömmlichen Probenahmeverrichtung musste aufgrund des vorhandenen Totvolumens eine erste Probe verworfen werden. Es wurde das zu verwerfende Probevolumen bis zur Konzentrationskonstanz von Glukose und Lactat ermittelt. In der herkömmlichen Vorrichtung gab es keine ideale Verdrängung der Probenflüssigkeit aus dem Leitungssystem, sondern

eine Rückvermischung einzelner Substanzen in der darin enthaltenen Strömung. Die Rückvermischung wurde verursacht durch unterschiedliche Diffusionskoeffizienten der Substanzen in der Probe und zusätzlich durch die fluiddynamischen Eigenschaften von Totvolumen und Probenflüssigkeit.

5

Die Entnahme der Probe mittels der herkömmlichen Vorrichtung erfolgte nicht kontinuierlich. Das Ventil dieser herkömmlichen Vorrichtung wurde als Drei-Wege-Ventil von einem Strömungsweg zwischen der Probenahmesonde und einem Ausgang auf einen Strömungsweg zwischen einem Überströmanschluß und dem Ausgang umgeschaltet, nachdem bereits 2 ml Probevolumen in das Leitungssystem gefördert wurden.

10

Dadurch riß der Flüssigkeitsstrom im Inneren der Vorrichtung ab, und es wurde die Durchmischung in der Strömung noch verstärkt. In diesem Fall führte die höhere Durchmischung zur Vergrößerung des benötigten Probevolumens bis zur Konzentrationskonstanz. Aus diesem Grunde wurde für die Zusammenfassung der Absolutwert des entnommenen Gesamtvolumens der herkömmlichen Vorrichtung auf etwa 2,5 ml gesenkt.

15

Während der Fermentation ergaben sich folgende Ergebnisse:

20

Nach der Sterilisation war Wasserdampf im Inneren der herkömmlichen Vorrichtung kondensiert und hatte das Totvolumen der Vorrichtung ausgefüllt. Es war nach dem Einschalten der Pumpe eine deutliche Unterscheidung zwischen dem farblosen Kondensat und dem rotgefärbten Medium möglich. Das aufgefangene und gemessene Totvolumen betrug ca. 0,6 ml. Die Mediumproben wurden in Eppendorf-Tipps gesammelt. Mit der herkömmlichen Vorrichtung mussten mindestens zwei Proben von je 2 ml Probevolumen gesammelt werden, bis eine konstante gemessene Substanzkonzentration eintrat. Dies gilt sowohl für die Glukosekonzentration als auch für die in Figur 4 dargestellte Lactatkonzentration. Dieser Vorgang wurde an den folgenden Tagen wiederholt. Damit ergab sich ein Mehrverbrauch an zu entnehmendem Medium gegenüber dem Probenahmevergange mittels der erfindungsgemäßen Probenahmeverrichtung zwischen 2 – 4 ml (100 – 200 %).

25

30

Aus der nachfolgenden Tabelle 1 läßt sich in vergleichender Darstellung ebenso wie aus den in Figuren 3 und 4 dargestellten Diagrammen die Entnahme von Proben aus dem Bioreaktor bis zum Konzentrationsausgleich von Glukose und Lactat bei einer Entnahme mittels der erfindungsgemäßen und der herkömmlichen Vorrichtung als Messergebnisse entnehmen:

35

Tabelle 1

Glucose [g/l]	Erfindung	Stand der Technik	Stand der Technik	Stand der Technik
t [d]	1. Probe	1. Probe	2. Probe	3. Probe
1	5.06	4.64	5.07	
2	5.03	4.95	4.99	
3	4.77	3.83	4.69	4.88
4	4.55	3.23	4.35	4.57
Lactat [g/l]				
t [d]				
1	0.19	0.17	0.18	
2	0.25	0.22	0.22	
3	0.43	0.92	0.45	0.41
4	0.68	1.04	0.65	0.57

In einem weiteren Versuch wurden aus einer Spinnerflasche mit Casolösung, die einer Nährbouillon für Sterilitests entspricht, mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung mehrfach Proben mit einem Volumen von 1,5 – 2 ml entnommen und analysiert. Über einen Versuchszeitraum von zwei Wochen hinweg war die Vorrichtung steril. Die Konzentration des Mediums innerhalb der Spinnerflasche an Glukose blieb annähernd konstant, abgesehen von Messgeräteschwankungen des Enzymsensors. Diese sind darauf zurückzuführen, dass der Enzymsensor empfindlich auf z. B. alternde Sensormembrane oder ungenügende Kalibrierautomatik reagierte. Aus der nachfolgenden Tabelle 2 ist die Glukosekonzentration, wie sie über mehrere Tage hinweg gemessen wurde, zu entnehmen.

Tabelle 2

t [d]	Konzentration [g/l Glc]	t [d]	Konzentration [g/l Glc]	t [d]	Konzentration [g/l Glc]
0	1,23	6	0,67	9	0,98
4	1,06	7	0,96	11	0,98
5	0,99	8	1,05	12	1,00

In einem Vorversuch wurde überprüft, ob die Konzentration an Glukose in einer Casolösung mit der Zeit von allein abnimmt. Dafür wurde eine Casolösung steril bei 37° C inkubiert. Die Analyse der Casolösung zeigt eine Stabilität über den Versuchszeitraum von vier Wochen, wie es der nachfolgenden Tabelle 3 zu entnehmen ist.

Tabelle 3

<i>t [d]</i>	<i>Konzentration [ g/l Glc]</i>	<i>t [d]</i>	<i>Konzentration [ g/l Glc]</i>
0	1,52	21	1,51
19	1,52	27	1,52

Die Ausführung der Erfindung ist nicht nur auf das beschriebene Beispiel und die hervorgehobenen Aspekte beschränkt, sondern ist im Rahmen der Ansprüche ebenso in einer Vielzahl von Abwandlungen möglich, die im Rahmen fachgemäßen Handelns liegen.

## Bezugszeichenliste

1	Behälter
2	Medium
3	Probenahmesonde
4	Rührer
5	Filtermembran
5a	Rückseite der Filtermembran
5b	Vorderseite der Filtermembran
6	Zuführleitung
7	Abführleitung
8	Pumpe
9	Abführrichtung
10	T-Stück
11, 14, 16, 24, 25	Ventile
12, 21, 26	Sterilfilter
13	Manometer
15, 23	Gasversorgungsanschluß
17	spülflüssigkeitsführende Anschlußleitung
18	Behälter
19	Spülflüssigkeit
20	Gas- und Spülflüssigkeitsanschlußleitung

- 22 Spülflüssigkeitsversorgungsanschluß
- 23 Gasversorgungsanschluß

---

**Vorrichtung und Verfahren zur Entnahme von flüssigen Proben**

---

**Patentansprüche**

- 5
1. Vorrichtung zur Entnahme von flüssigen Proben aus mit einem Medium (2) gefüllten Behältern (1) und/oder Rohren, insbesondere aus Fermentern, über eine Filtermembran (5) mittels Unterdruck,
- 10     dadurch gekennzeichnet, dass  
die innerhalb einer Probesonde (3) angeordnete Filtermembran (5) aus einem als Sterilgrenze wirkenden Material besteht, wobei auf der sterilen Grenzseite (5a) der Filtermembran (5) eine gasführbare Zuführleitung (6) und eine probeführbare Abführleitung (7) angeordnet sind.
- 15
2. Vorrichtung nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
das als Sterilgrenze wirkende Material hydrophil ist.
- 20
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die gasführbare Zuführleitung (6) ein hydrophobes Gas enthält.
4. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die gasführbare Zuführleitung (6) und die Abführleitung (7) derart ausgebildet sind,  
dass sie zum Zu- und Abführen von Gas mit Überdruck zu und von der  
Filtermembran (5) geeignet sind.
- 30
5. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die gasführbare Zuführleitung (6) an eine erste gasführende Anschlußleitung zum  
Verbinden der Zuführleitung (6) mit einem Gasversorgungsanschluß (15)  
angeschlossen ist.
- 35

6. Vorrichtung nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
ein erstes und zweites Ventil (11, 14) im Bereich des ersten und zweiten Endes der  
Anschlussleitung angeordnet sind.
- 5 7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
ein Drucksensor (13) in der gasführenden Anschlussleitung angeordnet ist.
- 10 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 – 7,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
ein erster Sterilfilter (12) in der gasführenden Anschlussleitung angeordnet ist.
- 15 9. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Zu- und Abführleitungen (6, 7) derart ausgebildet sind, dass sie zum Zu- und Ab-  
führen von Spülflüssigkeiten zu und von der Filtermembran (5) geeignet sind.
- 20 10. Vorrichtung nach Anspruch 9,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Zuführleitung (6) an eine zweite spülflüssigkeitsführende Anschlussleitung (17) an-  
geschlossen ist.
- 25 11. Vorrichtung nach Anspruch 10,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die spülflüssigkeitsführende Anschlussleitung (17) mit einem eine Spülflüssigkeit (19)  
enthaltenden Behälter (18) verbunden ist.
- 30 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 – 11,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
der Behälter (18) mit einem Spülflüssigkeitsversorgungsanschluß (22) über eine Gas-  
und Spülflüssigkeitsanschlussleitung (20) mit einem darin angeordneten weiteren  
Sterilfilter (21) verbunden ist.
- 35 13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 – 12,



dadurch gekennzeichnet, dass  
der Behälter (18) mit einem weiteren Gasversorgungsanschluß (23) über eine Gas-  
und Spülflüssigkeitsanschlussleitung (20) mit einem darin angeordneten weiteren  
Sterilfilter (26) verbunden ist.

5

14. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Abführleitung (7) mit einer ventilwirkenden Vorrichtung (8) verbunden ist.

10

15. Verfahren zur Entnahme von flüssigen Proben aus mit einem Medium (2) gefüllten  
Behältern (1) und/oder Rohren, insbesondere aus Fermentern, über eine  
Filtermembran (5) mittels Unterdruck  
gekennzeichnet durch  
folgende Schritte:

15

- Zuführen eines Gases zu einer in einer Probesonde angeordneten Filtermembran  
(5) aus einem als Sterilgrenze wirkenden Material auf der sterilen Grenzseite der  
Filtermembran (5) mittels einer mit mindestens einem Ventil (16) gegenüber  
anderen Leitungen sperrbaren Zuführleitung (6),
- Abführen des Gases von der Filtermembran (5) mittels einer Abführleitung (7) und  
Öffnen einer in der Abführleitung (7) angeordneten ventilwirkenden Vorrichtung  
(8) solange, bis die Zu- und Abführleitungen (6, 7) probenfrei sind,
- Schließen mindestens eines Ventils (11) zum Abkoppeln der Zuführleitung (6) von  
einem Gasversorgungsanschluß (15),
- Entnahme der Probe mit gewünschten Volumen aus dem Medium (2) mittels der  
Abführleitung (7) und einem in der Abführleitung (7) vorhandenen Unterdruck,  
und
- Beförderung der Probe aus der Abführleitung (7) mittels eines mit Überdruck  
erneut zugeführten Gases.

20

25

30

16. Verfahren nach Anspruch 15,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
zur Vermeidung von durch Inhaltsstoffe der Probe verursachte Verstopfungen und  
Verklebungen innerhalb der Abführleitung (7) eine Spülflüssigkeit (19) nach dem  
Schritt der Beförderung der Probe aus der Abführleitung (7) über die Zuführleitung  
(6) zugeführt und über die Abführleitung (7) abgeführt wird.

35

17. Verfahren nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
nach dem Schritt des Zu- und Abführens der Spülflüssigkeit (19) die Schritte des Zu-  
und Abführens des Gases wiederholt werden.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 – 17,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
ein Integritätstest zur Prüfung/Validierung der Funktion der Probenahme die Schritte  
umfasst:
- Verschließen der Abführleitung (7) durch eine ventilwirkende Vorrichtung (8),
  - Zuführen von Gas in die Zu- und Abführleitungen (6, 7) zur Erzeugung eines definierten Überdruckes,
  - Schließen eines weiteren Ventils (14) zur Abkopplung des  
Gasversorgungsanschlusses (15) von der Zuführleitung (6) unter Miteinbeziehung  
eines Drucksensors (13),
  - Beobachten von möglichen Gas- und/oder Flüssigkeitsein- und/oder -austritten  
aus dem Leitungssystem, und
  - Beobachten der Druckstabilität mittels des Drucksensors (13) als Indikator für die  
Integrität der Filtermembran (5).

---

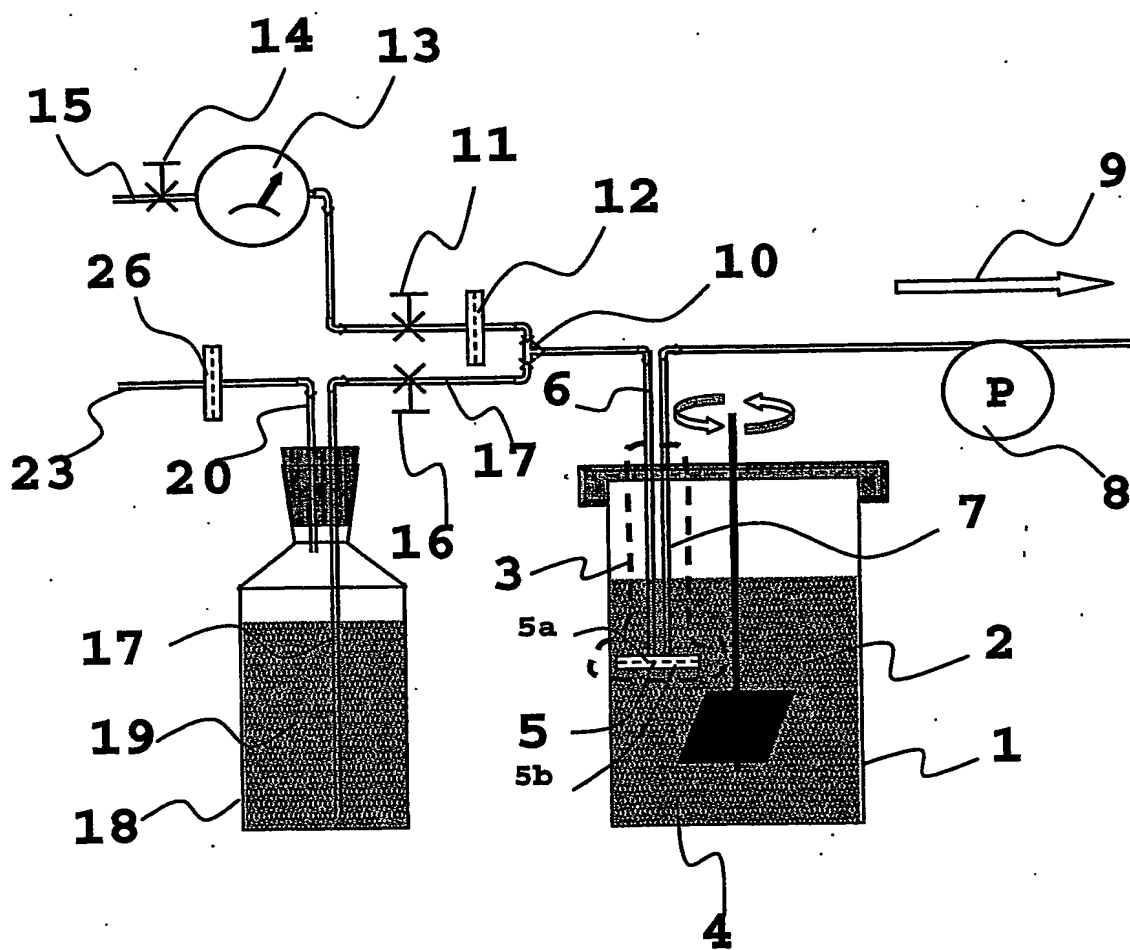
## Vorrichtung und Verfahren zur Entnahme von flüssigen Proben

---

### **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Entnahme von flüssigen Proben aus mit einem Medium (2) gefüllten Behältern (1) und/oder Rohren, insbesondere aus Fermentern, über eine Filtermembran (5) mittels Unterdruck, wobei die innerhalb einer Probesonde (3) angeordnete Filtermembran (5) aus einem als Sterilgrenze wirkenden Material besteht, wobei auf der sterilen Grenzseite (5a) der Filtermembran (5) eine gasführbare Zuführleitung (6) und eine probeführbare Abführleitung (7) angeordnet sind.

(Figur 1)



**Fig. 1**

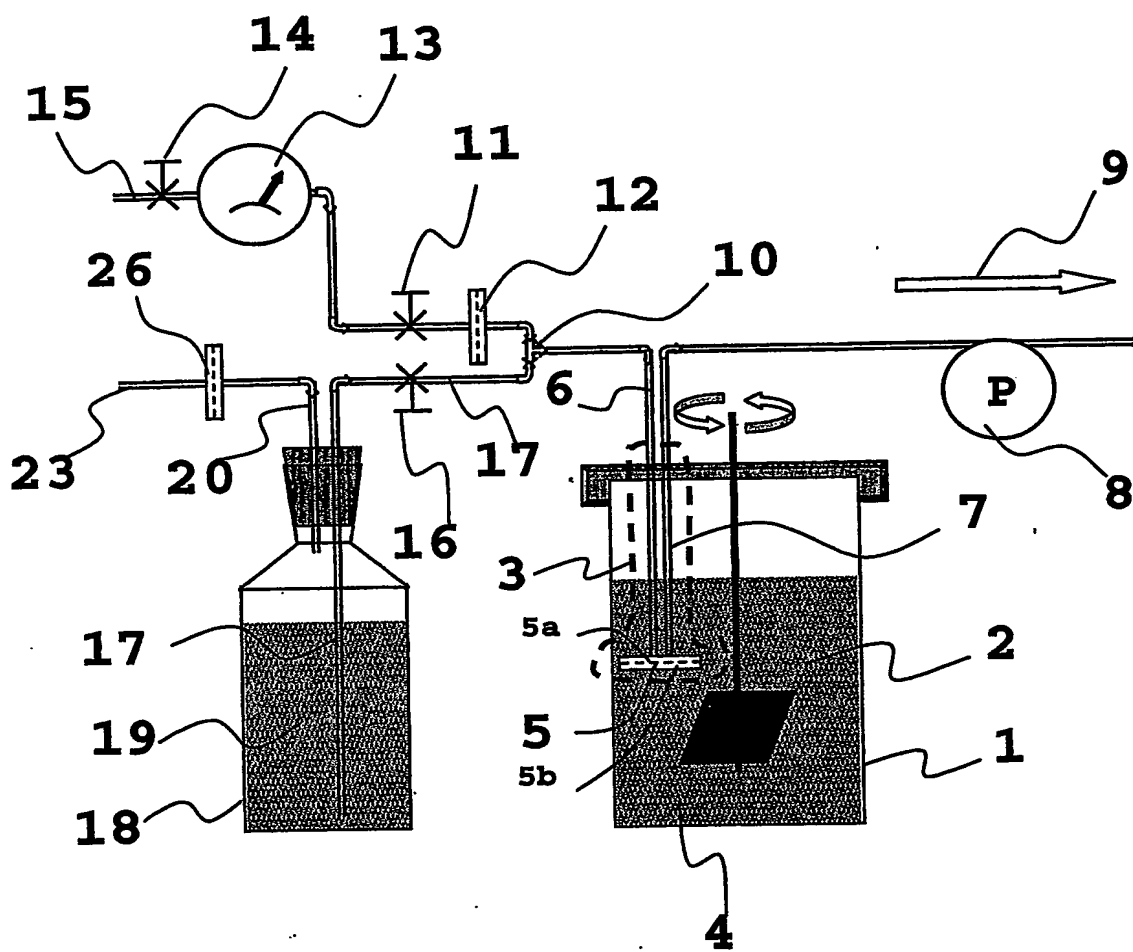


Fig. 1

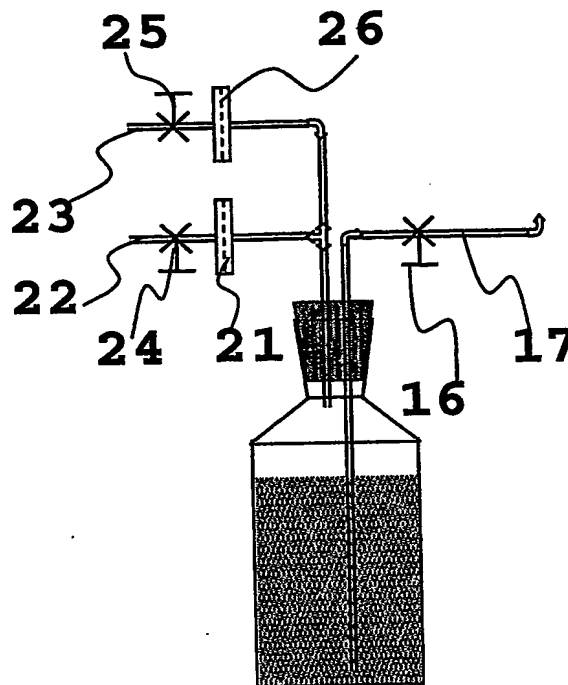


Fig.2

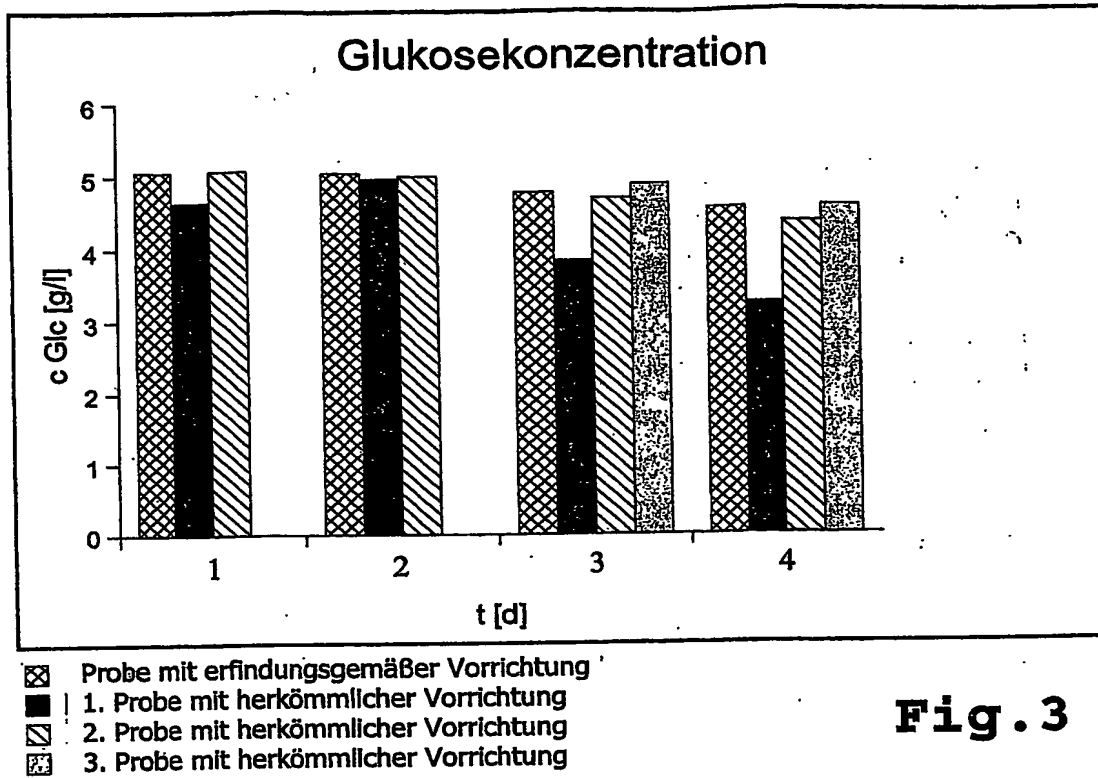


Fig. 3

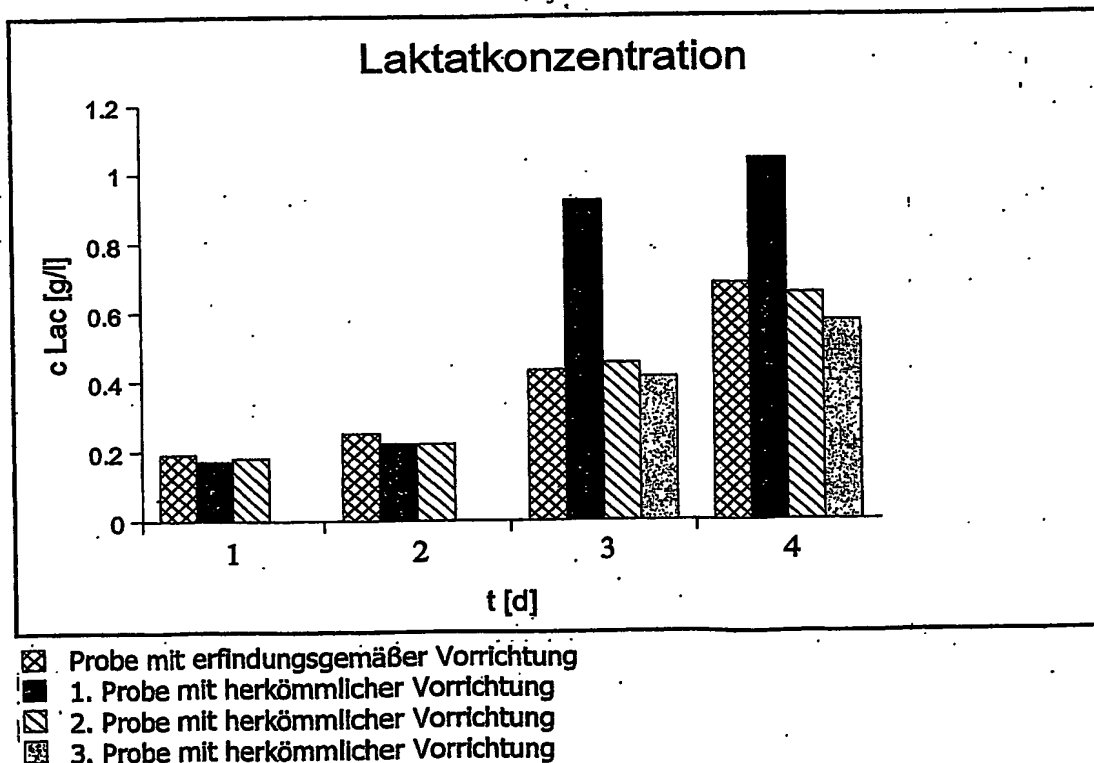


Fig. 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**